

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月6日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽

研究期間：2011～2012

課題番号：23659215

研究課題名（和文）遺伝子操作による成熟赤血球侵入型三日熱マラリア原虫の創出

研究課題名（英文）Genetic manipulation to generate transgenic *Plasmodium vivax* invasive to the mature erythrocytes

研究代表者

金子 修 (KANEKO OSAMU)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

研究成果の概要（和文）：幼若赤血球にのみ侵入する三日熱マラリア原虫を、成熟赤血球にも侵入できるようにするため、三日熱マラリア原虫のプロモーターで、成熟赤血球にも侵入できる熱帯熱マラリア原虫の赤血球認識分子を発現する三日熱マラリア原虫人工染色体を作製した。プロモーターの機能評価を完了し、セントロメア領域の評価の準備を完了した。患者から採取した血液中の三日熱マラリア原虫への遺伝子導入プロトコールを作製した。

研究成果の概要（英文）：In order to genetically modify *Plasmodium vivax* to invade into reticulocytes, I constructed artificial *P. vivax* chromosomes, from which a panel of *Plasmodium falciparum* erythrocyte ligands will be expressed under *P. vivax* merozoite-stage promoter. I also evaluated a transfection protocol to *P. vivax* obtained from infected patient in Thai field site.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：原虫、マラリア、培養、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

三日熱マラリア原虫の培養は、ヒト血液から精製した幼若赤血球や、血色素症患者の血液から得た幼若赤血球を用いる方法が報告されているが、得られる幼若赤血球は微量で、長期間の大量培養ができず、研究の大きなボトルネックとなっている。最近、ヒト臍帯血中の造血幹細胞から幼若赤血球を作製し、三日熱マラリア原虫の培養に用いる方法が発表されたが、高価で量的にも実用的なレベルでの培養には少なすぎる。研究代表者はマラリア原虫の赤血球認識リガンドの赤血球侵入における機能解析を行ってきたが、タイのマラリア流行地株の解析を進めるうちに、タ

イの共同研究者 Sattabongkot 博士と三日熱マラリア原虫の培養についても議論をする機会があり、現在まで幼若赤血球を大量に調整する方法にのみ着目して研究が進められていたことに気づいた。そこで、今まで考慮されていなかった原虫側の改変により、成熟赤血球にも侵入できる原虫を作れば、培養系が確立できるのではないかと、との着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 流行地においてマラリア患者から採取した血液中の三日熱マラリア原虫への遺伝子導入の方法を確立し、(2) 三日熱マラリ

ア原虫のプロモーターから、成熟赤血球に侵入することができる熱帯熱マラリア原虫の種々の赤血球侵入関連分子を発現させる人工染色体を作製し、(3) 幼若赤血球のみならず、全ステージの赤血球に侵入できる三日熱マラリア原虫を遺伝子改変技術により創出することで実用的レベルでの三日熱マラリア原虫の培養系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

三日熱マラリア原虫に遺伝子導入し、成熟赤血球に侵入する形質を付与することができるプラスミドの設計にあたり、(1) 熱帯熱マラリア原虫の成熟赤血球を認識するリガンド、(2) リガンドを三日熱マラリア原虫にて発現するプロモーター、(3) 導入したプラスミドが、三日熱マラリア原虫が増殖するに当たり、効率よく娘細胞に伝わることができるセントロメア領域(人工染色体機能)、の3つのコンポーネントを組み込むこととし、クローニングの後、できるものについては機能評価を行った。

同時に、タイの流行地にてマラリア患者から採取した血液中の三日熱マラリア原虫に対してルシフェラーゼ活性を指標に遺伝子導入ができるかどうかの検討を、三日熱マラリア原虫で活性があると報告されている熱帯熱マラリア原虫のプロモーターを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①熱帯熱マラリア原虫の赤血球認識リガンドの選定とクローニング:

三日熱マラリア原虫の赤血球認識リガンドのうち、幼若赤血球にのみ接着し、成熟赤血球には接着しないことが知られている網状赤血球結合タンパク質(PvRBP)の熱帯熱マラリア原虫相同体を中心として、RBP1、RBP2、RH4、RH5、RH5-interacting-protein (RIPR)、EBA-175、AMA1 の7つのタンパク質のクローニングを行った。しかし、本研究を進める過程で、AMA1 は宿主赤血球認識に直接関与していないことが明らかとなったため、選択から外した。また、RBP1 と RBP2 はともに約 8.8 kb とサイズが大きいためであろうか、PCR 産物のプラスミドへのクローニングが困難であり、将来的には赤血球認識ドメインのみを利用することも考慮することとし、当面は対象から外すこととした。最終的に残りの4つのリガンド遺伝子についてクローニングを完了した。

②赤血球侵入期に働く三日熱マラリア原虫のプロモーター領域のクローニングと評価:

PvRBP の 5' 非翻訳領域 1 kb によりルシフェラーゼを発現する組換え熱帯熱マラリア原虫を作製し、ルシフェラーゼ活性を検討したが、コントロールとして作製した他種マラリア原虫相同体のプロモーターからの活性は確認されたものの、PvRBP の 5' 非翻訳領域 1 kb からのルシフェラーゼ活性は見られなかった。非翻訳領域はマラリア原虫の種類間で必ずしも保存されていないことが知られているため、この結果は熱帯熱マラリア原虫では PvRBP のプロモーターが認識されないのか、あるいは、使用した PvRBP 5' 非翻訳領域 1 kb が短すぎた可能性が考えられた。そのため、PvRBP 5' 非翻訳領域 2 kb について、三日熱マラリア原虫と系統的に比較的近い位置にあるネズミマラリア原虫を用いて評価をすることとした。その結果、2 種類評価した PvRBP のうち、一つがネズミマラリア原虫の相同体遺伝子の 5' 非翻訳領域と同等レベルの転写活性を示した。つまり、この PvRBP の 5' 非翻訳領域を、三日熱マラリア原虫改変のために使用できることがわかった。

③三日熱マラリア原虫における人工染色体の開発と評価:

現在までに報告されている熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫のセントロメア領域の特徴を参考に、三日熱マラリア原虫の4つの染色体よりセントロメア領域(PvCEN)をPCR増幅し、プラスミドにクローニングを試みた結果、一つの染色体のセントロメア領域を含むプラスミドを得ることができた。他の3つについては、クローニングした配列を確認したところ、部分的に削除されており、最終プラスミドを得ることはできなかった。ちなみに、マラリア原虫のセントロメアの大腸菌によるクローニングが非常に困難で時間を要し、本研究を進めるうえでの律速段階の一つとなった。得られたPvCENを含むプラスミドと含まないコントロール・プラスミドを含む組換えネズミマラリア原虫を作出し、解析する準備を整えた。

一方、平成 24 年度にはオランダの霊長類医科学研究所の Kocken 博士との共同研究として、サルマラリア原虫を用いた実験を行うことが可能となったため、クローニングしたPvCENの機能をサルマラリア原虫を用いて評価することとし、国内研究協力者の後藤博士がオランダに2ヶ月間出張した。その結果、PvCENを含むプラスミドと含まないコントロール・プラスミドを持つ組換えサルマラリア

原虫を作出することに成功した。さらに、これらの組換えサルマラリア原虫を日本に輸入する準備を整えた。

④タイの流行地にてヒトから採取した患者血液中の三日熱マラリア原虫に対する遺伝子導入プロトコールの作成：

三日熱マラリア原虫への遺伝子導入条件を検討するために、平成 23 年度は後藤博士が、タイの研究協力者 Sattabongkot 博士が維持しているマヒドン大学カンチャナブリキャンパスの三日熱マラリア研究センターのもとに2カ月出張し、熱帯熱マラリア原虫と三日熱マラリア原虫の混合感染した検体を一つ得て、遺伝子導入を行い、ルシフェーゼ活性を検出することができた。これにより、少なくとも予定していた遺伝子導入プロトコールにより患者由来の血液中マラリア原虫に遺伝子導入することができることを検証できた。一方、マラリアクリニックを訪問する三日熱マラリア患者の血液中によく見られる、侵入後からやや成長した栄養体は遺伝子導入により死滅してしまうことが分かったため、対象とする原虫は侵入直後の小さな輪状体期に限定すべきことも明らかとなった。しかし、この年は稀に見る大洪水によりバンコクが浸水の危機に陥り、研究を中断し一時帰国せざるをえなくなり、マラリアの流行時期を逃してしまい、十分な数を検討する事が出来なかった。平成 24 年度には Xangsayarath 博士が2カ月出張し、実験に適する輪状体の三日熱マラリア原虫を一検体得、遺伝子導入を行ったがルシフェーゼ活性は検出できなかった。この条件下で電気穿孔による遺伝子導入を行った三日熱マラリア原虫を 25 時間培養した後に観察すると、熱帯熱マラリア原虫であれば活性が検出できるであろうと予想されるぐらい十分な数の原虫が発育していたため（最終赤血球感染率 0.12%）、用いた熱帯熱マラリア原虫のプロモーターは三日熱マラリア原虫では活性はあるものの、その強さが弱い可能性が考えられ、適切なプロモーターを用いれば転写活性を検出する事が可能であると考えた。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

今回、流行地でマラリア患者から採取された患者血液中のマラリア原虫に直接、電気穿孔により遺伝子導入を行うプロトコールを世界で初めて確立した。現在、マラリア原虫への遺伝子導入は実験室で確立された培養株や動物モデルでのみ行われているが、将来的に、自然な状態で患者体内で発育しているマラリア原虫を遺伝子導入の手法で解析す

るに当たり、少なくとも熱帯熱マラリア原虫については、今回確立した方法が基礎的な条件を提供することになる。

また、本研究は三日熱マラリア原虫の赤血球侵入期プロモーター活性を他種マラリア原虫種で世界で検出したものである。さらに、完全に評価は完了してはいないものの三日熱マラリア原虫の人工染色体を世界で初めて構築した。この人工染色体の構築にはかなり時間を要したため、本人工染色体は、将来、三日熱マラリア原虫の遺伝子改変の必須のツールとなるものと考えている。

(3) まとめと今後の展望

本研究の遂行にあたり、多くのハードルがあり、研究期間中に予定した全ての実験を行うことができなかった。

①まず、人工染色体作製のためのセントロメア領域のクローニングに多大の時間を費やした。しかし、最終的には完成することができた。

②続いて、三日熱マラリア原虫の非翻訳領域・セントロメア領域の機能解析が次の律速段階となった。これらの領域がマラリア原虫の種類間で必ずしも保存されておらず、また、三日熱マラリア原虫の近縁種であるサルマラリア原虫の培養株が、国内に存在しなかったためである。しかし、本研究期間中にオランダの研究者に共同研究を提案し、本解析に適したサルマラリア原虫を代表研究者の手元に入手できることとなった。そのため、これらの解析は近日中に完了する予定である。

③最後に、タイのマラリアクリニックに来院する三日熱マラリア患者のうち、遺伝子導入実験に適した患者は、輪状体期の原虫に感染している患者のみであることがわかり、対象を絞ることができるようになった。また、患者血液中の三日熱マラリア原虫への遺伝子導入プロトコールについても、間接的な観察の結果ではあるが、現在のものを使用することで妥当であるとの結論に至ったため、今後は当初に予定した実験、すなわち、作製した熱帯熱マラリア原虫分子を発現する三日熱マラリア原虫用人工染色体を三日熱マラリア原虫に遺伝子導入し、成熟赤血球で効率よく増殖できる原虫を得ることができかどうかを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

特記すべきものなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 修 (KANeko OSAMU)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50325370

(2) 連携研究者

矢幡 一英 (YAHATA KAZUHIDE)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：40467965

(3) 研究協力者

後藤 美穂 (GOTO MIHO)
長崎大学・熱帯医学研究所・産学官連携研
究員

Phonepadith Xangsayarath
長崎大学・熱帯医学研究所・産学官連携研
究員

Jetsumon Sattabongkot
マヒドン大学熱帯医学部・主任研究者

Clemens Kocken
霊長類医科学研究センター・寄生虫学分
野・主任研究者